

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12Q 1/68	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/37038 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. Oktober 1997 (09.10.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/01494 (22) Internationales Anmeldedatum: 25. März 1997 (25.03.97) (30) Prioritätsdaten: 196 12 779.3 29. März 1996 (29.03.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FREY, Bruno [DE/DE]; Hochfeldstrasse 50, D-82377 Penzberg (DE). KÜBLER, Hildegund [DE/DE]; Bussardstrasse 6, D-82362 Weilheim (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: PROCESS FOR THE SPECIFIC MULTIPLICATION OF LONG NUCLEIC ACIDS BY PCR (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR SPEZIFISCHEN VERVIELFÄLTIGUNG VON LANGEN NUKLEINSÄUREN DURCH PCR (57) Abstract <p>The invention relates to an enzyme mixture consisting of two thermostable DNA polymerases with and without proof-reading activity, a thermostable pyrophosphatase and other auxiliaries for PCR and its use for the multiplication of particularly long single and double-stranded nucleotide fragments. The process for multiplying the long DNA fragments is distinguished in particular by the use of the enzyme mixture, a tricine-NH₃ buffer and an elongation temperature of about 68 °C.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft eine Enzymmischung bestehend aus zwei thermostabilen DNA-Polymerasen mit und ohne proofreading-Aktivität, einer thermostabilen Pyrophosphatase sowie weitere Hilfssubstanzen für die PCR und deren Verwendung zur Vervielfältigung von besonders langen einzel- und doppelsträngigen Nukleotid-Fragmenten. Das Verfahren zur Vervielfältigung der langen DNA-Fragmente zeichnet sich insbesondere durch die Verwendung der Enzymmischung, eines Tricine-NH₃ Puffers, und einer Elongationstemperatur von ca. 68 °C aus.</p>		